Mode d'emploi

Détermination quantitative de l'élastase 1 pancréatique

Test sur Selles

Instruction Manual

Quantitative Determination of Pancreatic Elastase 1

Stool Test

ScheBo® • Elastase 1 Pancréatique

REF Réf./Cat.-No. : 07

IVD Pour Diagnostic *in Vitro*
For *in vitro* diagnostic use only Σ 96

Développé et fabriqué par/ Developed and manufactured by,

ScheBo® • Biotech Aktiengesellschaft, Netanyastr. 3 (Europaviertel)

35394 Giessen (Germany)
Phone +49-(0)641-4996-0 • Fax +49-(0)641-4996-77 • www.schebo.com

Test protégé par des brevets internationaux

LOT (Novembre 2010)
valable à partir du lot 49

www.tuv.com TÜV ID:0000007990
- Certified Management System
- EN ISO 9001
- EN ISO 13485

Table es matières

	D'un coup d'oeil	4
1	Introduction	7
1.1	Physiopathologie	7
1.2	Avantages	7
1.3	Sensibilité et spécificité	8
1.4	Principe du dosage	9
1.5	Limite de détection	9
1.6	Fidélité	9
1.7	Interférences	10
2	Réactifs	10
3	Echantillons et stabilité des échantillons	11
4	Conservation et stabilité de la trousse	11
5	Matériel supplémentaire requis	11
6	Précautions	12
7	Conseils pour une performance optimale du dosage	12
7.1	Personnel à contacter	13
8	Technique de dosage	13
8.1	Préparation	13
8.1.1	Préparation du tampon de lavage/-dilution de l'échantillon	13
8.1.2	Préparation de la plaque ELISA	13
8.1.3	Préparation de l'échantillon fécal	14
8.1.3.1	Exécution avec l'E1 Quick-Prep™	14
	Diagramme de l'extraction des selles avec l'E1 Quick-Prep™	15
8.1.3.2	Exécution par la méthode de pesée	16
8.2.	Procédure de dosage	17
8.2.1	Incubation des échantillons et étalons	17
8.2.2	Incubation du complexe d'anti-E1-bio et POD-streptavidine	18
8.2.3	Réaction colorée	19
8.2.4	Arrêt de la réaction colorée	19
8.2.5	Mesure	19
8.3	Evaluation des résultats	19
8.3.1	Evaluation manuelle	19
8.3.2	Evaluation avec logiciel - ELISA	20
8.3.3	Concentrations de référence pour l'élastase 1 pancréatique	20
9	Bibliographie	34
10	Résumé du dosage pour l'utilisateur expérimenté	revers

E1 Quick-Prep™ est une marque déposée de ScheBo® · Biotech AG, Allemagne

Table of Contents

	At A Glance	6
1	Introduction	21
1.1	Pathobiochemistry	21
1.2	Advantages	21
1.3	Sensitivity and specificity	22
1.4	Basic principle of the assay	23
1.5	Detection limit	23
1.6	Precision	23
1.7	Interferences	23
2	Reagents	24
3	Sample material and sample stability	24
4	Storage and stability of the test kit	25
5	Additional utensils required	25
6	Precautions	25
7	Recommendations for optimal test performance	25
7.1	Contact persons	26
8	Test procedure	27
8.1	Preparation	27
8.1.1	Preparation of sample-/washing buffer	27
8.1.2	Preparation of ELISA plate	27
8.1.3	Preparation of stool specimen	27
8.1.3.1	Using the E1 Quick-Prep™ sample preparation system	27
	Diagram of stool extraction with the E1 Quick-Prep™	28
8.1.3.2	Using the weighing method	29
8.2	Assay procedure	30
8.2.1	Incubation of samples and standards	30
8.2.2	Incubation with complex of anti-E1-bio and POD-Streptavidin	31
8.2.3	Color reaction	32
8.2.4	Stopping the color reaction	32
8.2.5	Measurement	32
8.3	Quantification of results	32
8.3.1	Manual evaluation	32
8.3.2	Evaluation by ELISA - software	33
8.3.3	Reference concentrations for pancreatic elastase 1	33
9	References	34
10	Short Protocol	Back Page

Quick-Prep™ is a registered trademark of ScheBo®• Biotech AG, Germany

D'un coup d'oeil

Trousse ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 Stool

Indications principales :

- Diagnostic/Exclusion de **l'insuffisance pancréatique exocrine** provoquée par exemple par **pancréatite chronique, fibrose kystique** (**mucoviscidose**), **diabète sucré, lithiase biliaire** (**calculs biliaires**), **cancer du pancréas, sténose papillaire, « trouble de la croissance »**
- **Etude du suivi** des patients atteints d'insuffisance pancréatique légère à modérée
- Diagnostic/Exclusion de l'implication pancréatique dans la **douleur abdominale, les symptômes gastro-intestinaux, l'ostéoporose.**

Principaux Avantages :

- La thérapie de substitution enzymatique n'a pas d'influence sur les résultats du test.
- La grande stabilité de l'élastase 1 pancréatique permet l'expédition des échantillons.
- La méthode possède une grande spécificité et sensibilité:

  Spécificité: 93 % **Sensibilité: 93 %**
- L'élastase 1 pancréatique est stable tout au long du transit intestinal et elle est entièrement spécifique du pancréas.
- La variation intra-individuelle de la concentration d'élastase 1 pancréatique est faible.

Méthode de détection :

- ELISA sandwich avec deux anticorps monoclonaux hautement spécifiques de l'élastase 1 pancréatique humaine.
- La trousse ELISA contient une plaque de dosage (96 puits) avec **12 barrettes sécables de 8 puits** chacune pour le dosage de jusqu'à **42 échantillons en doublets.**

Concentration de référence :

- Pour adultes et enfants de plus d'un mois
- Valeurs **>200 µg élastase/g fèces** indiquent une fonction pancréatique exocrine normale.
- Valeurs **< 200 µg élastase/g fèces** indiquent une insuffisance pancréatique

Echantillons :

- Echantillon fécal (environ 100 mg) ou suc duodénal
- Les échantillons **sont stables pour l'expédition** et peuvent être conservés dans le laboratoire jusqu'à **3 jours à 4° - 8° C** ou jusqu'à **1 an à -20° C.**
- Les extraits fécaux non dilués sont stables pendant 1 jour à 4° - 8° C ou jusqu'à 1 an à -20° C.

At A Glance

ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 Stool Test

Main Indications:

- Diagnosis/exclusion of exocrine **pancreatic insufficiency** caused by e.g. **Chronic Pancreatitis, Cystic Fibrosis, Diabetes Mellitus, Cholelithiasis** (**Gallstones**)**, "Failure to Thrive", Pancreatic Cancer, Papillary Stenosis**
- **Follow-up monitoring** of patients with mild or moderate pancreatic insufficiency
- Diagnosis/exclusion of pancreatic involvement in association with **gastrointestinal symptoms, abdominal pain, osteoporosis**

Main Advantages:

- Digestive enzyme substitution therapy has no influence on the result of the test
- High stability allows time for convenient mailing of samples
- High specificity and sensitivity: **Specificity: 93%, Sensitivity: 93%**
- Pancreatic elastase 1 is stable during intestinal transit and absolutely pancreas-specific.
- Intra-individual variation of pancreatic elastase 1 concentration is low.

Method of Detection:

- Sandwich ELISA with two monoclonal antibodies highly specific for human pancreatic elastase 1
- The ELISA kit is based on a microtiter plate (96 well format) with **12 breakable single strips x 8 wells** suitable for up to **42 samples in duplicate**

Reference Concentration:

For adults and children after the first month of life

- Values **> 200 µg elastase/g stool** indicate normal exocrine pancreatic function
- Values **< 200 µg elastase/g stool** indicate exocrine pancreatic insufficiency

Sample Material:

- Single random stool sample (about **100 mg**) or duodenal juice
- Samples are **stable for convenient mailing** and may be stored in the laboratory up to **3 days at 4° - 8° C** or for up to **1 year at -20°C**.
- Undiluted stool extracts are stable for 1 day at 4° - 8° C or for up to 1 year at -20°C.

1 Introduction

ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 Stool Test pour la détermination quantitative des taux fécaux d'élastase 1 pancréatique par des **professionnels de la santé**.

1.1 Physiopathologie

L'élastase 1 (**E1**) **pancréatique** humaine est stable tout au long du transit intestinal. Par conséquent, sa concentration dans les **fèces** reflète la **fonction exocrine du pancréas**. Pendant la phase aiguë de l'inflammation pancréatique, l'**E1** est libérée dans le sang. Ainsi, la détermination quantitative de l'élastase 1 pancréatique dans le **sérum** permet le diagnostic ou l'exclusion de la **pancréatite aiguë**.

1.2 Avantages

Le test Schebo® • Pancreatic Elastase 1 Stool, fiable et rentable, est la **nouvelle méthode de référence**, non invasive, pour la détermination de la fonction pancréatique. Contrairement aux autres paramètres de laboratoire pour le diagnostic de la maladie pancréatique (amylase et lipase sériques pour le diagnostic de la pancréatite aiguë et chymotrypsine fécale pour le diagnostic de l'insuffisance pancréatique exocrine), la détermination de l'élastase 1 pancréatique possède les avantages suivants:

- L'**E1** est entièrement spécifique du pancréas.
- Puisque l'**E1** est stable tout au long du transit intestinal, la concentration fécale d'élastase 1 reflète le pouvoir de sécrétion du pancréas (diagnostic ou exclusion d'insuffisance exocrine pancréatique).
- L'**E1** montre une bonne corrélation avec les tests invasifs de stimulation pancréatique par sécrétine-pancréozymine et sécrétine-caeruléine (tests de référence).
- La variation intra-individuelle de la concentration de l'**E1** fécale est faible.
- Un traitement substitutif n'a aucune influence sur la détermination de l'**E1**. Les anticorps monoclonaux utilisés n'ont pas de réaction croisée avec les élastases d'origine animale contenues dans les préparations enzymatiques de substitution.

- Tout comme les autres enzymes pancréatiques, l'**E1** est libérée dans le sang pendant la phase aiguë de l'inflammation. En raison de sa demi-vie plus longue que celle de l'amylase et de la lipase, sa concentration reste élevée plus longtemps. Ceci permet encore un dépistage de la pancréatite aiguë 3 à 4 jours après le début de la maladie.

Deux trousses ELISA (basées sur des anticorps monoclonaux) sont disponibles pour la détermination de l'**élastase 1 pancréatique**. Le **test sérique** mesure l'**E1** dans le sérum et permet le diagnostic ou l'exclusion d'une **pancréatite aiguë** ou d'un **épisode inflammatoire de pancréatite chronique** ou **pancréatite induite par une ERCP ou par des calculs biliaires**. Le **test fécal** mesure l'E1 dans les fèces (ou le suc duodénal) et **permet le diagnostic ou l'exclusion d'insuffisance pancréatique exocrine**, qui peut être provoquée par **pancréatite chronique**, **fibrose kystique** (**mucoviscidose**), **tumeur pancréatique, lithiase biliaire** ou **diabète sucré**, par exemple.

E1 test sérique: Réf.-No. : 06 **E1 test fécal: Réf.-No. : 07**

1.3 Sensibilité et spécificité

L'efficacité diagnostique du dosage de l'élastase 1 pancréatique fécale a été évaluée dans plusieurs études cliniques. Löser *et al.* (1996) signalent **93% de sensibilité et 93% de spécificité** pour le diagnostic de l'insuffisance pancréatique exocrine.

Stein *et al.* (1996), Löser *et al.* (1996) ainsi que Katschinski *et al.* (1997) ont démontré une bonne corrélation entre le test E1 et les méthodes invasives (c.-à-d. le test sécrétine-pancréozymine et le test sécrétine-caeruléine).

Dans les études comparatives, le ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 Stool Test a montré qu'il était plus sensible que le test de chymotrypsine fécale, en particulier dans l'insuffisance pancréatique légère à modérée (Walkowiak *et al.* (2002), Löser *et al.* (1995 & 1996), Katschinski *et al.* (1997), Glasbrenner *et al.* (1996), Gullo *et al.* (1999)).

Dominguez-Muñoz *et al.* (1995) et Glasbrenner *et al.* (1996) ont montré que la détermination d'E1 est plus spécifique que le test pancréolauryl (PLT) avec une sensibilité comparable. L'E1 a montré aussi une meilleure corrélation avec la

réponse clinique à l'enzyme pancréatique de thérapie de remplacement que le PLT (Elphick & Kapur (2005)).
De plus, des études avec l'E1 ont montré une excellente sensibilité et spécificité pour le diagnostic de la mucoviscidose avec insuffisance pancréatique (Beharry *et al.* (2002), Cade *et al.* (2000), Walkowiak *et al.* (1999 & 2002), Phillips *et al.* (1999), Terbrack *et al.* (1996), Soldan *et al.* (1996), Gullo *et al.* (1997), Wallis *et al.* (1997)).

1.4 Principe du dosage

La plaque ELISA est constituée de puits revêtus d'un anticorps monoclonal anti-élastase 1 pancréatique humaine (E1). A la suite d'une première incubation, l'E1 des échantillons et des étalons se lie à l'anticorps fixé sur la paroi des puits. Un complexe formé par l'anticorps monoclonal anti-élastase 1 biotinylé et la peroxydase (POD)-streptavidine se lie à l'E1 pendant l'incubation suivante. La peroxydase oxyde l'ABTS (acide 2, 2'-Azino-*bis*-(3-éthylbenzothiazolin-6-sulfonique) sel diammonium) du substrat qui devient vert foncé. L'intensité de la coloration, proportionnelle à la concentration d'E1, est mesurée à l'aide d'un photomètre.

1.5 Limite de détection

L'élastase pancréatique 1 a été déterminée dans l'intervalle de 15 à 500 µg/g d'E1/g de fèces. Les concentrations inférieures à l'étalon le plus bas doivent être reportées comme < 15 µg E1/g fèces. Les valeurs supérieures à l'étalon le plus haut doivent être reportées comme > 500 µg E1/g fèces.

1.6 Fidélité

La variabilité intra-essai (répétabilité) a été évaluée en dosant 20 fois, 6 prélèvements fécaux (32-405 µg E1/g fèces). Le coefficient de variation (CV) moyen a été de 5,8 % (intervalle : 4,0-8,5 %) La variabilité inter-essais (reproductibilité) a été calculée par le dosage de 7 prélèvements fécaux sur dix jours différents. Le coefficient de variation (CV) moyen a été de 7,6 % (intervalle: 4,8-10,6 %).

1.7 Interférences

En raison de la dilution de la concentration d'E1 dans les selles très liquides, les valeurs peuvent être diminuées dans ces échantillons. Par conséquent, il est recommandé de signaler la consistance de selles liquides et de demander un prélèvement d'échantillon normal, en cas d'une valeur pathologique (< 200 µg E1/g fèces).

Il n'existe pas d'autres facteurs connus interférant avec le dosage. En particulier, la thérapie enzymatique de substitution n'a pas d'influence sur le dosage de l'élastase 1.

2 Réactifs

1. **12 barrettes ELISA sécables** avec 8 puits chacune revêtus d'un anticorps monoclonal anti élastase 1 pancréatique humaine (E1), 96 puits.
2. **Tampon de lavage/-dilution** de l'échantillon concentré (5x) (bouchon noir), 100 ml Tampon phosphaté, pH 7,2, avec détergents
3. **Etalons E1 1 à 4,** prêts à l'emploi (bouchon bleu), 700 µl chacun élastase 1 pancréatique humaine en solution aqueuse avec azide de sodium
4. **Contrôle 1,** prêt à l'emploi (bouchon violet), 700 µl élastase 1 pancréatique humaine en solution aqueuse avec azide de sodium
5. **Contrôle 2**, prêt à l'emploi (bouchon vert), 700 µl élastase 1 pancréatique humaine en solution aqueuse avec azide de sodium
6. **Complexe d'anticorps monoclonal anti-E1 conjugué à la biotine et POD-streptavidine** (= anti-E1-bio-POD-Streptavidin-Comp.), prêt à l'emploi, sensible à la lumière (flacon plastique noir, bouchon noir) 8 ml en solution aqueuse avec conservateur
7. **Solution de substrat, prête à l'emploi, sensible à la lumière** (bouchon rouge), 12 ml ABTS (2,2'-Azino-bis(acide 3-éthylbenzothiazolin-6-sulfonique)) en solution aqueuse
8. **Solution d'arrêt, prête à l'emploi** (bouchon blanc), 12 ml Solution aqueuse alcaline

3 Echantillons et stabilité des échantillons

Echantillons : Un simple échantillon fécal (une quantité de la taille d'un pois est suffisante – environ 100 mg)

Stabilité des échantillons : Les échantillons peuvent être conservés dans le laboratoire jusqu'à trois jours à 4 - 8 °C ou jusqu'à un an à -20 °C. Les extraits fécaux dilués peuvent être conservés à 4 - 8 °C pendant une journée ou jusqu'à un an à -20 °C.

La trousse ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 stool convient aussi pour déterminer la concentration d'E1 dans le suc duodénal.

Les performances n'ont pas été établies pour d'autres types d'échantillons

4 Conservation et stabilité de la trousse

Tous les composants de cette trousse sont stables à 4-8°C jusqu'à la date de péremption indiquée sur les étiquettes. La trousse ne doit pas être utilisée après la date de péremption. Les barrettes ELISA et/o les puits non utilisés doivent être conservés dans le sachet refermable contenant un dessicateur. S'assurer que le sachet est complètement fermé.

5 Matériel supplémentaire requis

- tubes en polystyrène à usage unique (5 ml, 10 ml et 12 ml) avec bouchons
- éprouvette graduée 500 ml
- mélangeur vortex
- pipettes de précision réglables 0-50 µl, 50-200 µl, et 200-1000 µl
- pipettes de 5 ml et 10 ml
- pipette à 8 canaux réglable 50-250 µl
- lecteur ELISA capable de lire l'absorbance à 405 nm

6 Précautions

Pour diagnostic *in vitro*. Le tampon d'extraction, les étalons, le contrôle et le complexe d'anti-E1-bio et POD-streptavidine contiennent un conservateur. **Respecter les règles de sécurité. Eviter le contact avec la peau.** Ne pas effectuer de pipetage avec la bouche. Porter des gants jetables pendant la réalisation des dosages. Une feuille des données de sécurité est disponible sur demande. Ne pas mélanger des réactifs provenant de lots différents.

7 Conseils pour une performance optimale du dosage

1. Respecter strictement la notice d'emploi.
2. Tous les composants de la trousse doivent être conservés à 4 - 8°C. Porter tous les réactifs, y compris la plaque ELISA, à température ambiante juste avant l'utilisation. Conserver tous les réactifs, immédiatement après utilisation, à 4 - 8°C.
3. Mélanger tous les réactifs liquides avant utilisation. Eviter des gouttes dans les bouchons des tubes.
4. Ne pas toucher le fond de la plaque ELISA.
5. Distribuer dans les puits de la plaque ELISA dans le même ordre et avec des intervalles réguliers.
6. Afin d'éviter des contaminations, n'utiliser que des embouts et de réservoirs de pipettes propres. Ne pas utiliser le même réservoir pour différents réactifs (ex. solution de substrat et d'arrêt).
7. Pipetage
   - Pipeter tous les réactifs et les échantillons dans le tiers inférieur du puits.
   - Pour le lavage, maintenir l'embout de pipette dans le bord supérieur des puits.
8. Lavage
   - Avant chaque étape de lavage, retourner la plaque et **taper fermement** sur une serviette propre en papier pour **éliminer tout liquide résiduel.**
   - N'utiliser que du papier absorbant propre pour essuyer le liquide.

- Veiller à ce que le liquide ne coule pas.
- **Incuber** avec du tampon de lavage pendant **au moins 1-2 minutes** pour chaque période de lavage.

9. Mesure

- Agiter délicatement la plaque avant chaque mesure pour obtenir une distribution homogène de la coloration.
- **Eliminer les bulles d'air** avec une aiguille propre.
- **Après l'ajout de la solution d'arrêt, attendre au moins cinq minutes avant de mesurer.**

7.1 Personnel à contacter

ScheBo®• Biotech AG
Netanyastr. 3, 35394 Giessen, Allemagne
Tel: 0049-(0)641-4996-0, Fax: 0049-(0)641-4996-77
http://www.schebo.com, e-mail: schebo@schebo.com

- **votre distributeur local**

8 Technique de dosage

8.1 Préparation

8.1.1 Préparation du tampon de lavage/-dilution de l'échantillon

100 ml de tampon de lavage/-dilution de l'échantillon x5 (bouchon noir) + 400 ml d'eau bidistillée. Le tampon de lavage/-dilution de l'échantillon dilué est stable pendant 6 mois à 4 - 8 °C.

8.1.2 Préparation de la plaque ELISA

Porter la plaque ELISA a température ambiante avant ouverture. Déchirer le sachet refermable au niveau de l'encoche, l'ouvrir et prélever le nombre nécessaire de barrettes sécables. **Les barrettes ELISA et/o les puits non utilisés doivent être conservés dans le sachet refermable contenant un dessicateur. S'assurer que le sachet est complètement fermé.**

8.1.3 Préparation de l'échantillon fécal

- Le dispositif doseur E1 Quick-Prep™ peut être utilisé: Pour une plus grande facilité et rapidité, il es conseillé d'utiliser le dispositif doseur E1 Quick-Prep™ (réf. 07-Quick, voir 8.1.3.1) ou bien
- Méthode de pesée : l'échantillon de selles peut être pesé (voir 8.1.3.1)

8.1.3.1 Réalisation avec l'E1 Quick-Prep™

Le tampon d'extraction prêt à l'emploi est déjà inclus dans les tubes du système E1 Quick-Prep™! Voir sur la boîte la date de péremption.

Préparation des échantillons de selles

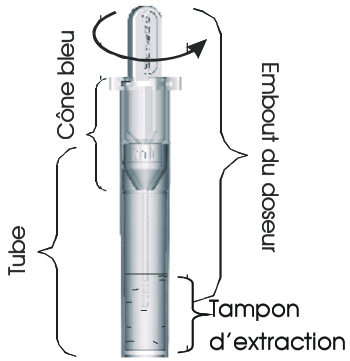
Le ScheBo® • E1 Quick-Prep™ (réf. 07-Quick) doit être utilisé comme indiqué dans la figure 1 (page 15).

Dilution des extraits fécaux (1/70)

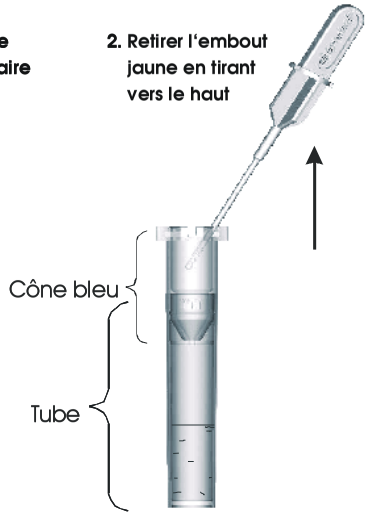
Préparation de la dilution 1/70 :
10 µl échantillon extrait + 700 µl tampon de lavage/-dilution de l'échantillon

Extraction des selles avec E1 Quick-Prep™

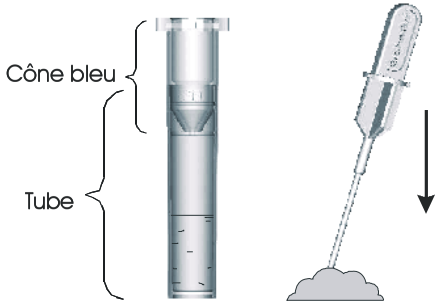
1. Tourner l'embout du doseur jaune (uniquement) dans le sens contraire aux aiguilles d'une montre



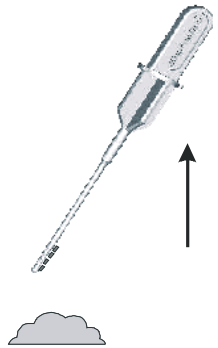
2. Retirer l'embout jaune en tirant vers le haut



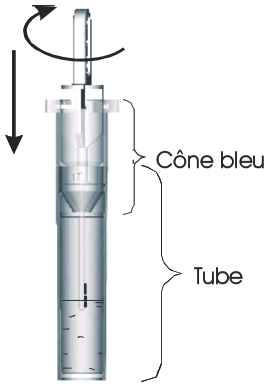
3. Insérer l'embout jaune dans l'échantillon de selles à une profondeur de 1 cm (tout l'espace entre les traits doit être rempli de selles)



4. Retirer l'embout jaune du doseur



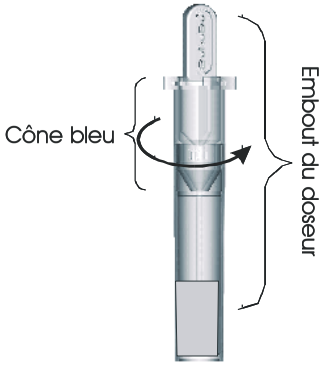
5. Insérer l'embout jaune dans le tube à travers le cône bleu et tourner l'embout jaune dans le sens des aiguilles d'une montre



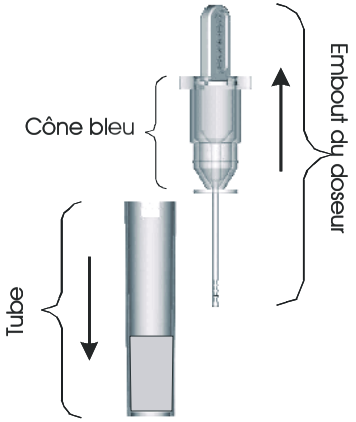
6. Bien mélanger (vortex)
7. Extraire pendant 10 minutes
8. Bien mélanger de nouveau

Attention! S'assurer qu'il NE RESTE PAS de selles dans l'embout du doseur

9. Tourner le cône bleu dans le sens contraire aux aiguilles d'une montre, puis pousser ou soulever jusqu'à un click d'ouverture



10. Retirer le cône bleu et l'embout jaune (ensemble) du tube



11. Après stabilisation des particules, diluer l'échantillon de selles extrait au 1/70 (10 µl d'extrait de selles + 700 µl de diluant-/tampon de lavage x1) Compléter le test comme indiqué dans la notice d'utilisation (voir section 8.2, p. 17)

Figura 1

8.1.3.2 Exécution avec la méthode de pesée

Tampon d'extraction concentré (**5x**) Pour échantillons fécaux (flacon carré, bouchon vert), 100 ml (**réf.-no. 02**) Tampon phosphaté, pH 7,2, avec détergents et azide de sodium

Préparation du tampon d'extraction :

100 ml de tampon d'extraction x5 (**réf.-no. 02**) + 400 ml d'eau bidistillée. Le tampon d'extraction dilué est stable pendant 6 mois à 4 - 8 °C.

Pesée des échantillons fécaux

Faire la tare du tube et de la tige en plastique sur une balance digitale sensible. Prélever une petite quantité (environ 100 mg) de l'échantillon fécal avec la boucle de la tige et remettre la tige dans le tube pour peser l'échantillon. Un cure-dents ou un applicateur en bois peut être utilisé à la place de la tige.

Ajouter le volume du tampon d'extraction en fonction du poids de l'échantillon, (ex. 100 mg fèces + 10 ml tampon d'extraction ou 75 mg fèces + 7,5 ml tampon d'extraction). La concentration finale doit être 10 mg fèces/ml tampon d'extraction.

Homogénéisation et extraction des échantillons fécaux

Bien mélanger la suspension à l'aide d'un agitateur (utiliser un agitateur vortex), à température ambiante. Les fèces doivent être bien homogénéisées pour assurer une extraction complète d'élastase pancréatique 1. Après une période d'extraction d'au moins cinq minutes, mélanger encore une fois. Les dilutions sont réalisées une fois que les particules sont déposées. Comme l'élastase 1 pancréatique est très stable, la période d'extraction peut être prolongée jusqu'à 24h à 4 - 8 °C et les dilutions peuvent être réalisées le lendemain.

Dilution des extraits fécaux (**1/250**)

Préparation de la dilution 1/250:

10 µl échantillon extrait + 2,5 ml tampon de lavage/-dilution de l`échantillon

8.2 Procédure de dosage

8.2.1 Incubation des échantillons et étalons

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blanc	Blanc	E3	E3	E11	E11	E19	E19	E27	E27	E35	E35
B	Etal1	Etal1	E4	E4	E12	E12	E20	E20	E28	E28	E36	E36
C	Etal2	Etal2	E5	E5	E13	E13	E21	E21	E29	E29	E37	E37
D	Etal3	Etal3	E6	E6	E14	E14	E22	E22	E30	E30	E38	E38
E	Etal4	Etal4	E7	E7	E15	E15	E23	E23	E31	E31	E39	E39
F	C	C	E8	E8	E16	E16	E24	E24	E32	E32	E40	E40
G	E1	E1	E9	E9	E17	E17	E25	E25	E33	E33	E41	E41
H	E2	E2	E10	E10	E18	E18	E26	E26	E34	E34	E42	E42

Figure 2: Schéma proposé

Etal: étalons

C: contrôle

E1-E42: échantillons

Blanc = puits A1 et A2; déposer 50 µl de tampon de lavage/-dilution de l'échantillon dans chaque puits.

Etalons (bouchon bleu) prêts à l'emploi; déposer 50 µl de chaque étalon (non dilué) dans les puits des colonnes 1 et 2 en doublets.

Fèces

Etalon 1 correspond à 15 µg/g

Etalon 2 correspond à 50 µg/g

Etalon 3 correspond à 150 µg/g

Etalon 4 correspond à 500 µg/g

Contrôle 1 (bouchon violet), prêt à l'emploi**;** déposer 50 µl dans les puits F1 et F2. Le contrôle 1 doit être déterminé dans chaque série.

Contrôle 2, prêt à l'emploi (bouchon vert).

Le contrôle 2 doit être utilisé lorsqu'il est demandé par la législation ou la réglementation locale ou nationale et/ou les organismes d'accréditation. Distribuer 50 µl dans les puits G1 et G2 (à la place d'un échantillon)

Fèces

Contrôle1 correspond à 200 µg/g ± 15 %

Contrôle 2 – la concentration est imprimée sur l'étiquette du flacon

Déposer 50 µl d'extrait fécal dilué (voir 8.1.3.1 et 8.1.3.2) de chaque échantillon dans chacun des deux puits adjacents. Le contrôle peut aussi être utilisé comme contrôle interne.

Incuber pendant 30 minutes à température ambiante.

Lavage : Vider les puits et laver chaque puits 3 fois avec le tampon de lavage/-dilution de l'échantillon (pipettes multicanaux à 8 voies, 250 µl/puits). Retourner la plaque et **taper fermement** sur du papier absorbant propre pour **éliminer complètement tout liquide résiduel**.

8.2.2 Incubation du complexe d'anti-E1-bio et POD-streptavidine

Ajouter 50 µl/puits du complexe d'anti-E1-bio et POD-streptavidine = anti-E1-bio-POD-Streptavidin-Comp. prêt à l'emploi (flacon plastique noir avec bouchon noir).

Incuber pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Lavage : Vider les puits et laver chaque puits 3 fois avec le tampon de lavage/-dilution de l'échantillon (pipettes multicanaux à 8 voies, 250 µl/puits). Retourner la plaque et **taper fermement** sur du papier absorbant propre pour **éliminer complètement tout liquide résiduel**.

8.2.3 Réaction colorée

Déposer 100 µl de solution de substrat prête à l'emploi (bouchon rouge) dans chaque puits.

Incuber pendant 15 minutes à température ambiante et à l'abri de la lumière.

(Il peut s'avérer nécessaire de raccourcir ce temps si on utilise un lecteur de plaques ELISA ou un lecteur automatique qui ne lit les absorbances que jusqu'à 2,5 ou 3.)

8.2.4 Arrêt de la réaction colorée

Arrêter la réaction avec le substrat en ajoutant 100 µl de solution d'arrêt par puits (prête à l'emploi, bouchon blanc). Mélanger le contenu des puits en agitant la plaque.

8.2.5 Mesure

Lire la densité optique à **405 nm** avec un lecteur de microplaques **entre 5 et 30 minutes** après ajout de la solution d'arrêt. Mélanger le contenu des puits avant la lecture. Une longueur d'onde de **492 nm** peut être utilisée comme référence.

8.3 Evaluation des résultats

8.3.1 Evaluation manuelle

Calculer la valeur moyenne des densités optiques de tous les doublets après avoir soustrait la valeur moyenne du blanc.
Tracer la courbe d'étalonnage en plaçant la valeur de concentration des échantillons versus la densité optique correspondante sur un papier bilogarithmique.
La concentration des échantillons peut être lue directement à l'aide de la courbe d'étalonnage, puisque le facteur de dilution a été pris en compte pour le calcul des étalons.

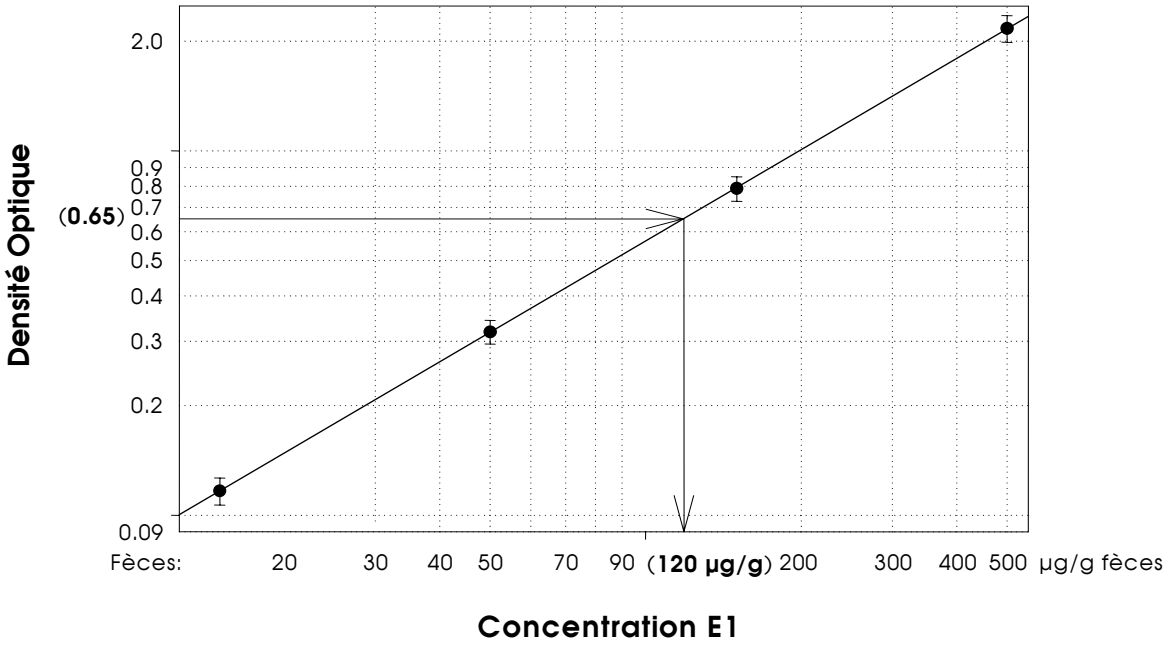


Figure 3: Exemple d'une courbe d'étalonnage type

Exemple: La densité optique moyenne après soustraction du blanc est 0,65. Cette densité optique correspond à une concentration de 120 µg E1/g fèces (voir courbe d'étalonnage).

8.3.2 Evaluation avec logiciel - ELISA

Disposer le blanc, les étalons et les échantillons selon le schéma de la plaque (figure 2). Utiliser une méthode de régression linéaire à échelle bilogarithmique.

8.3.3 Concentrations de référence pour l'élastase 1 pancréatique

Dans les fèces :

normale :	200 à > 500	µg E1/g fèces
insuffisance pancréatique exocrine modérée à légère :	100 – 200	µg E1/g fèces
insuffisance pancréatique exocrine :	< 100	µg E1/g fèces

Ces concentrations d'élastase 1 pancréatique correspondent à des échantillons fécaux de consistance normale. Dans les cas de concentrations pathologiques d'élastase 1 (< 200 µg E1/g fèces) dans des échantillons de selles liquides, il serait nécessaire d'obtenir un second échantillon de fèces normales (voir chapitre 1.7).

1 Introduction

ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 Stool Test for the quantitative determination of fecal levels of pancreatic elastase 1 by **healthcare professionals**.

1.1 Pathobiochemistry

Human **pancreatic elastase 1** (**E1**) remains undegraded during intestinal transit. Therefore its concentration in **feces** reflects **exocrine pancreatic function**. During an inflammation of the pancreas, E1 is released into the bloodstream. Thus the quantification of pancreatic elastase 1 in **serum** allows diagnosis or exclusion of **acute pancreatitis**.

1.2 Advantages

The reliable and cost-effective ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 Stool Test is the **new gold standard** for non-invasive pancreatic function testing. In contrast to other laboratory parameters for the diagnosis of pancreatic disease (amylase and lipase activity in serum for the diagnosis of acute pancreatitis and fecal chymotrypsin activity for the diagnosis of exocrine pancreatic insufficiency), the determination of pancreatic elastase 1 has the following advantages:

- E1 is absolutely pancreas-specific.
- Since E1 is stable during intestinal transit, the fecal elastase 1 concentration reflects the secretory capacity of the pancreas (diagnosis or exclusion of pancreatic exocrine insufficiency).
- E1 determination correlates with the gold standard invasive secretin-pancreozymin test and the secretin-caerulein test.
- Intra-individual variation of fecal E1 concentration is low.
- Enzyme substitution therapy has no influence on the determination of E1. The monoclonal antibodies used in the test do not cross-react with elastases of animal origin, which are contained in enzyme substitution preparations.
- Like other pancreatic enzymes, E1 is released into the bloodstream during pancreatic inflammation. Due to its longer half-life, compared to amylase and lipase, its concentration remains elevated longer, and an acute

pancreatitis is detectable even three or four days after onset of the disease.

Two ELISA test kits (based on monoclonal antibodies) are available for the determination of **pancreatic elastase 1**. The **serum test** quantifies E1 in serum, allowing the diagnosis or exclusion of an **acute pancreatitis** or an **inflammatory episode of chronic pancreatitis** or **ERCP- or gallstone-induced pancreatitis**. The stool test quantifies **E1 in feces** (or duodenal juice), allowing the diagnosis or exclusion of **pancreatic exocrine insufficiency**, which can be caused by **chronic pancreatitis, cystic fibrosis, diabetes mellitus, cholelithiasis** (**gallstones**), **"failure to thrive", pancreatic cancer or papillary stenosis,** for example.

E1 serum test:cat. no.: 06
E1 stool test: cat. no.: 07

1.3 Sensitivity and specificity

The diagnostic efficiency of pancreatic elastase 1 determination in stool has been evaluated in many clinical studies. Löser *et al.* (1996) reported **93% sensitivity and 93% specificity** for the diagnosis of exocrine pancreatic insufficiency.

Stein *et al.* (1996), Löser *et al.* (1996) and Katschinski *et al.* (1997) have demonstrated a good correlation between E1 and invasive intubation tests (i.e. the secretin-pancreozymin test and the secretin-caerulein test).

In comparative studies, the ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 Stool Test has been shown to be more sensitive than the fecal chymotrypsin test, especially in mild to moderate disease (Walkowiak *et al.* (2002), Löser *et al.* (1995 & 1996), Katschinski *et al.* (1997), Glasbrenner *et al.* (1996), Gullo *et al.* (1999)). Dominguez-Muñoz *et al.* (1995) and Glasbrenner *et al.* (1996) showed that E1 determination is more specific than the pancreolauryl test (PLT) at a comparable sensitivity. E1 has also demonstrated a better correlation with clinical response to pancreatic enzyme replacement therapy than PLT (Elphick & Kapur (2005)).

In addition, studies with E1 have shown an excellent sensitivity and specificity for the diagnosis of cystic fibrosis with pancreatic involvement (Beharry *et al.* (2002), Cade *et al.* (2000), Walkowiak *et al.* (1999 & 2002), Phillips *et al.* (1999),

Terbrack *et al.* (1996), Soldan *et al.* (1996), Gullo *et al.* (1997), Wallis *et al.* (1997)).

1.4 Basic principle of the assay

The ELISA plate is coated with a monoclonal antibody which only recognizes human pancreatic elastase 1 (E1). E1 from samples and standards binds to the antibody and is immobilized on the plate. A complex of monoclonal anti-Elastase 1-Biotin and Peroxidase (POD)-Streptavidin binds to E1 during the next incubation. The peroxidase oxidizes ABTS (2, 2'-Azino-*bis*-(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonic acid) diammonium salt), which turns dark green. Finally, the concentration of oxidized ABTS is determined photometrically.

1.5 Detection limit

Pancreatic elastase 1 is determined within the range of 15 to 500 µg E1/g stool. Concentrations below the lowest standard should be stated as < 15 µg E1/g stool. Values above the highest standard should be indicated as > 500 µg E1/g stool.

1.6 Precision

The intra-assay variance was evaluated by 20-fold determination of six stool samples (32-405 µg E1/g stool). The average coefficient of variance (CV) was 5.8% (range: 4.0-8.5 %).

The inter-assay variance was calculated with seven stools, which were tested on ten different days. The mean CV was 7.6 % (range: 4.8 - 10.6 %).

1.7 Interferences

Due to dilution the E1 concentration may be lowered in very watery stool samples. Therefore it is recommended to note the consistency of watery stools. In case of a pathological result (< 200 µg E1/g stool) a formed stool sample should be requested.

There are no other factors known which interfere with the test. In particular, enzyme substitution therapy does not influence the determination of elastase 1.

2 Reagents

1. **12 breakable ELISA-strips** with 8 wells each coated with a monoclonal antibody to human pancreatic Elastase 1 (E1), 96 wells
2. **Sample-/ washing buffer concentrate** (**5x**) (black cap), 100 ml phosphate buffered saline, pH 7.2, with detergent
3. **E1 standards 1 to 4, ready-to-use** (blue cap), 700 µl each human pancreatic elastase 1 in aqueous solution with sodium azide
4. **Control 1, ready-to-use** (violet cap), 700 µl human pancreatic elastase 1 in aqueous solution with sodium azide
5. **Control 2, ready-to-use** (green cap), 700 µl human pancreatic elastase 1 in aqueous solution with sodium azide
6. **Complex of monoclonal anti-E1-biotin and POD-Streptavidin** (= anti-E1-bio-POD-Streptavidin-Comp.), ready-to-use, light sensitive (black plastic vial with black cap), 8 ml in aqueous solution with preservative
7. **Substrate solution, ready-to-use, light sensitive** (red cap), 12 ml ABTS in aqueous solution
8. **Stop solution, ready-to-use** (white cap), 12 ml alkaline aqueous solution

3 Sample material and sample stability

Sample material: A single random formed stool sample (a pea-sized amount is sufficient – circa 100 mg).

Sample stability: Samples are stable for convenient mailing and may then be stored in the laboratory for up to three days at 4 - 8 °C or up to one year at -20 °C. Undiluted stool extracts may be stored at 4 - 8 °C for one day or up to one year at -20 °C.

The ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 stool test is also suitable to determine the concentration of E1 in duodenal juice (please contact us for further information). Performance characteristics have not been established for other types of samples.

4 Storage and stability of the test kit

All components of the test kit are stable at 4 - 8 °C until the expiry date shown on the kit labels. The kit must not be used after the expiry date. Unused ELISA-strips and/or wells must be stored in the re-sealable foil bag containing the desiccant, making sure the seal is completely closed.

5 Additional utensils required

- Polystyrene test tubes (5 ml,10 ml and 12 ml) with caps
- 500 ml graduated cylinder
- vortex mixer
- adjustable precision pipettes: 0-50 µl, 50-200 µl, and 200-1000 µl
- 5 ml and 10 ml pipettes
- adjustable 8 channel pipette 50-250 µl
- ELISA reader capable of reading absorbance at 405 nm.

6 Precautions

For *in vitro* diagnostic use only. Extraction buffer, standards, control and the complex of anti-E1-bio and POD-Streptavidin contain a preservative. **Please observe the safety regulations. Avoid skin contact. Do not pipette by mouth. Wear disposable gloves** while performing the tests. A materials safety data sheet is available on request. Do not mix materials from different master lots.

7 Recommendations for optimal test performance

1. Follow the instruction manual precisely.
2. All components of the test kit have to be stored at 4 - 8 °C. Bring all reagents including the ELISA plate to room temperature shortly before use. After using store all reagents at 4 - 8 °C immediately.
3. Vortex all liquid reagents before use. Avoid droplets in the caps of the tubes.
4. Do not touch the bottom of the ELISA plate.
5. Always work up the ELISA plate in identical order and equal time intervals.

6. To avoid contamination use clean pipette tips and clean receptacles. Do not use the same receptacle for different reagents (e.g substrate and stop solution).
7. Pipetting
   - Pipette all reagents and samples into the lower third of a well
   - For washing hold the pipette tips at the upper rim of the wells
8. Washing
   - Before each washing step, invert the plate and **tap hard** on a clean paper towel to **remove any remaining liquid**.
   - Use only clean paper towels for draining off liquid.
   - Make sure that no liquid drains back.
   - Incubate with washing buffer at least **1-2 minutes per washing step**.
9. Measurement
   - Agitate plate well before each measurement to ensure even distribution of the dye.
   - **Remove any bubbles** with a clean needle.
   - Wait at least five minutes after adding the stop solution before measuring.

7.1 Contact persons

Dr. Karin Decker
ScheBo®• Biotech AG
Netanyastr. 3, 35394 Giessen, Germany
Tel: +49-(0)641-4996-0, Fax: +49-(0)641-4996-77
http://www.schebo.de, e-mail: schebo@schebo.com

- your local distributor

8 Test procedure

8.1 Preparation

8.1.1 Preparation of sample-/washing buffer

100 ml sample-/washing buffer 5x (black cap) + 400 ml bidistilled water.
The diluted sample-/washing buffer is stable for 6 months at 4 - 8 °C.

8.1.2 Preparation of ELISA plate

Bring ELISA plate to room temperature before opening. Tear open the resealable foil bag where indicated by the notch, open the re-sealable closure and remove desired number of breakable ELISA strips. **Unused ELISA strips and/or wells must be stored in the resealable foil bag containing the desiccant, making sure the seal is completely closed.**

8.1.3 Preparation of stool specimen

- We recommend the E1 Quick-Prep™ dosing device (cat. no. 07-Quick, see 8.1.3.1) is used for speed and convenience, or alternatively
- Weighing method: stool specimen can be weighed (see 8.1.3.2)

8.1.3.1 Using the E1 Quick-Prep™ sample preparation system

The tubes of the ScheBo® • E1 Quick-Prep™ sample preparation system contain ready-to-use extraction buffer. See the imprint on the packaging for the expiry date.

Preparation of stool specimens

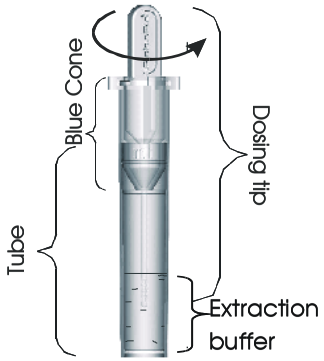
The ScheBo® • E1 Quick-Prep™ (cat. no. 07-Quick) should be used according to figure 1 (page 28).

Dilution of stool extracts (**1:70**)

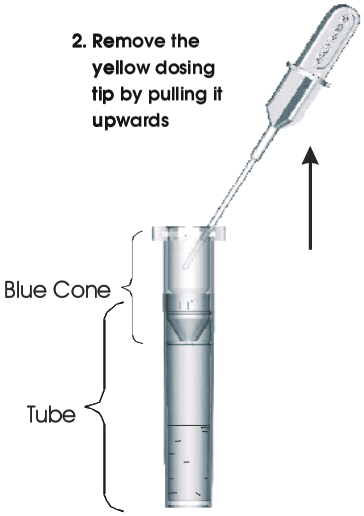
Preparation of 1:70 dilution:
10 µl extracted stool sample+ 700 µl sample-/washing buffer

Stool extraction with E1 Quick-Prep™

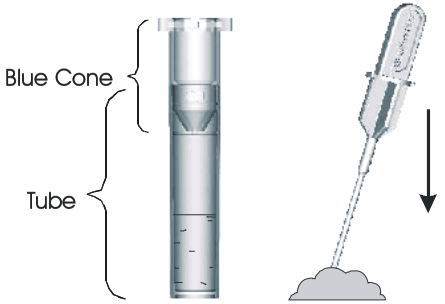
1. Turn the yellow dosing tip (only) anti-clockwise



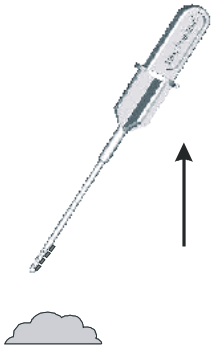
2. Remove the yellow dosing tip by pulling it upwards



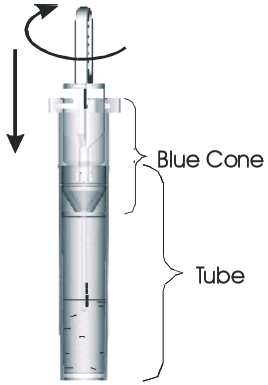
3. Insert the yellow dosing tip in stool sample to a depth of c. 1cm (all notches must be filled with stool)



4. Remove the yellow dosing tip

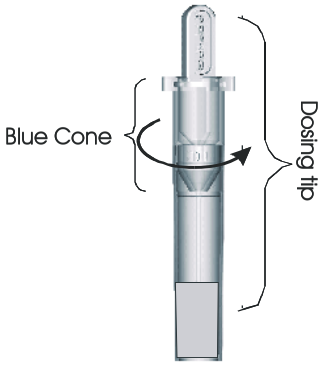


5. Insert the yellow dosing tip into the tube through the blue cone and turn the yellow dosing tip clockwise

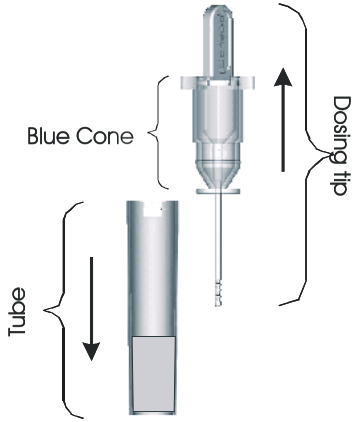


6. Mix well (vortex)
7. Extract for 10 minutes
8. Then mix again
Attention! Make sure NO stool is left on the dosing tip!

9. Twist the blue cone anti-clockwise, then push or lift upwards until it clicks open



10. Remove the blue cone and yellow dosing tip (together) from the tube



11. After the particles have settled, dilute the stool sample extract 1:70 (10 µl stool sample extract + 700 µl sample-/washing buffer 1x) Complete the test as described in the instruction manual (see section 8.2, page 30)

Figure 1

8.1.3.2 Performance with the weighing method

Extraction buffer concentrate (**5x**) for stool specimen (square flask, green cap), 100 ml (**cat. no.: 02**) phosphate buffered saline, pH 7.2, with detergent and sodium azide

Preparation of extraction buffer

Dilute the extraction buffer (5x) (cat. no.: 02):100 ml extraction buffer 5x + 400 ml bidistilled water. The diluted extraction buffer is stable for 6 months at 4 - 8 °C.

Weighing the stool specimen

Tare tube and inoculating loop on a sensitive digital laboratory balance. Take a small sample (approximately 100 mg) from the stool specimen with the inoculating loop and replace the loop into the tube to weigh the sample. A wooden applicator or tooth pick may be used instead of the inoculating loop. Add extraction buffer to the stool sample according to the mass of the sample, (e.g. 100 mg stool + 10 ml extraction buffer or 75 mg stool + 7.5 ml extraction buffer). The final concentration must be 10 mg stool/ml extraction buffer.

Homogenisation and extraction of stool samples

Vortex the stool suspension thoroughly at room temperature. Stool suspensions must be homogenized to ensure a complete extraction of pancreatic elastase 1. After an extraction period of at least five minutes, vortex the suspension again. Then, after any particles have settled, dilute the stool extracts. Because pancreatic elastase 1 is very stable, the extraction period may be extended for up to 24h at 4 - 8 °C and the dilutions can be performed the next day.

Dilution of stool extracts (**1:250**)

Preparation of 1:250 dilution:

10 µl extracted stool sample + 2.5 ml sample-/washing buffer.

8.2 Assay procedure

8.2.1 Incubation of samples and standards

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Blank	Blank	S3	S3	S11	S11	S19	S19	S27	S27	S35	S35
B	STD1	STD1	S4	S4	S12	S12	S20	S20	S28	S28	S36	S36
C	STD2	STD2	S5	S5	S13	S13	S21	S21	S29	S29	S37	S37
D	STD3	STD3	S6	S6	S14	S14	S22	S22	S30	S30	S38	S38
E	STD4	STD4	S7	S7	S15	S15	S23	S23	S31	S31	S39	S39
F	CON	CON	S8	S8	S16	S16	S24	S24	S32	S32	S40	S40
G	S1	S1	S9	S9	S17	S17	S25	S25	S33	S33	S41	S41
H	S2	S2	S10	S10	S18	S18	S26	S26	S34	S34	S42	S42

Figure 2: Possible plate layout

STD: standards
CON: control
S1-S42: samples

Blank = wells A1 and A2; pipette 50 µl of sample-/washing buffer into each well.

Standards (blue cap) are ready-to-use; pipette 50 µl of each standard (undiluted) into columns 1 and 2 as duplicate.

Stool

Standard 1 corresponds to 15 µg/g
Standard 2 corresponds to 50 µg/g
Standard 3 corresponds to 150 µg/g
Standard 4 corresponds to 500 µg/g

Control 1, ready-to-use (violet cap); pipette 50 µl into wells F1 and F2. Control 1 must be determined on each run.

Control 2, ready-to-use (green cap).

Control 2 may be used if required by local, state or national regulations/ guidelines or accrediting organisations.

Pipette 50 µl into wells G1 and G2 (instead of a sample).

Stool

Control 1 corresponds to 200 µg/g ± 15 %

Control 2 - see label for concentration

Pipette 50 µl of extracted diluted stool specimen (see 8.1.3.1 und 8.1.3.2) from each sample into each of two adjacent wells. The control can also be used as an internal control.

Incubate for 30 minutes at room temperature.

Washing: Empty the wells and wash each well 3 times with sample-/washing buffer (8 channel pipette, 250 µl/well). Invert the plate and **tap it hard** on a clean paper towel to **completely remove any remaining liquid.**

8.2.2 Incubation with complex of anti-E1-bio and POD-Streptavidin

Add 50 µl/well ready-to-use complex of anti-E1-biotin and POD-Streptavidin = anti-E1-bio-POD-Streptavidin-Comp. (black plastic vial with black cap)

Incubate for 15 minutes in the dark at room temperature.

Washing: Empty the wells and wash each well 3 times with sample-/washing buffer (8 channel pipette, 250 µl/well). Invert the plate and **tap it hard** on a clean paper towel to **completely remove any remaining liquid.**

8.2.3 Color Reaction

Add 100 µl of ready-to-use substrate solution (red cap) to each well.

Incubate for 15 minutes in the dark at room temperature.
(You may need to shorten this time when using an ELISA plate-reader or a fully automated machine which reads absorbances up to only 2.5 or 3.)

8.2.4 Stopping the color reaction

Stop the substrate reaction by adding 100 µl of stop solution per well (ready-to-use, white cap). Mix contents well by agitating the plate.

8.2.5 Measurement

Read the optical density at **405 nm** with a microtiter plate reader **between 5 and 30 minutes** after addition of the stop solution. Mix contents well before measuring. **492 nm** can be used as a reference wavelength.

8.3 Quantification of results

8.3.1 Manual evaluation

Calculate the mean optical densities of all duplicates after mean blank value has been substracted. Plot the concentration of standards versus their corresponding optical densities on a log-log paper = standard curve.

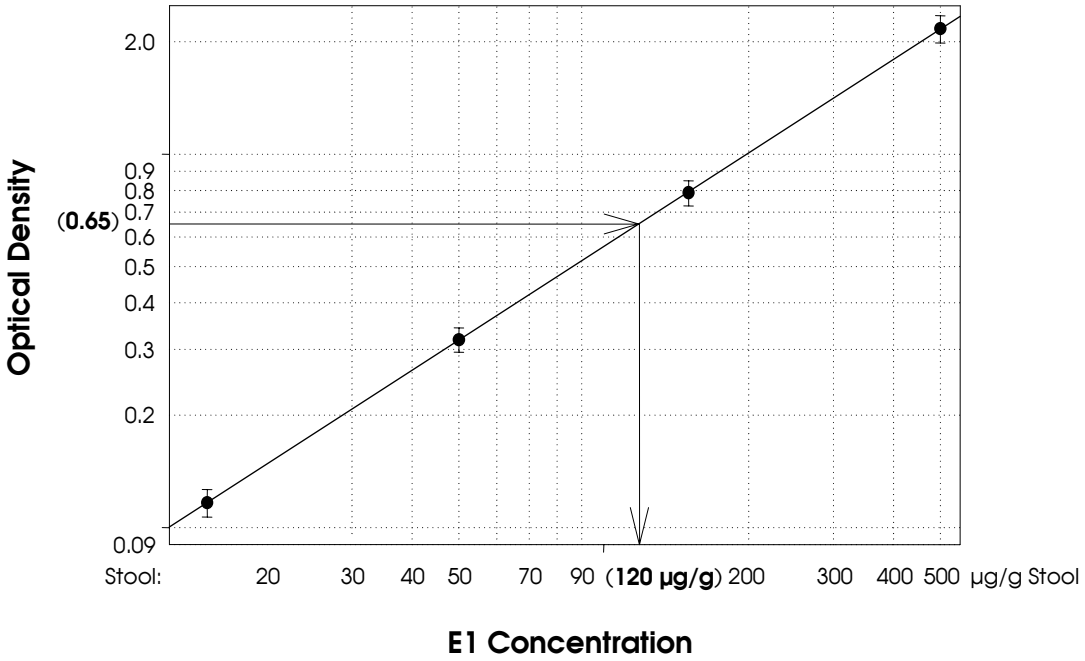


Figure 3: Typical example of a standard curve

Example: The average optical density after the mean blank value has been subtracted was 0.65. This optical density corresponds to a concentration of 120 µg E1/g stool (see standard curve).

8.3.2 Evaluation by ELISA - software

Define blank, standards and samples according to the plate layout (figure 2). Use the curve - fit method (linear regression) with log - log scale.

8.3.3 Reference concentrations for pancreatic elastase 1

In stool:

normal:	200 to >500 µg E1/g stool
moderate to mild exocrine pancreatic insufficiency:	100 – 200 µg E1/g stool
severe exocrine pancreatic insufficiency:	<100 µg E1/g stool

These pancreatic elastase 1 concentrations refer to formed stool samples. In case of pathological elastase 1 concentrations (< 200 µg E1/ g stool) in watery stool samples a second formed stool sample should be requested (see section 1.7).

9 Literatur - References

Büchler, M., Malfertheiner, P., Uhl, W., Beger, H.G. (1986) Diagnostic and prognostic value of serum elastase 1 in acute pancreatitis, Klin Wochenschrift 64: 1186 - 1191

Borowitz, D., Baker, S.S., Duffy, L., Baker, R.D., Fitzpatrick, L., Gyamfi, J., Jarembek, K. (2004) Use of fecal elastase-1 to classify pancreatic status in patients with cystic fibrosis, J Pediatr 145: 322-326

Cade, A., Walters, M.P., McGinley, N., Firth, J., Brownlee, K.G., Conway, S.P., Littlewood, J.M. (2000) Evaluation of fecal pancreatic elastase 1 as a measure of pancreatic exocrine function in children with cystic fibrosis, Pedr Pulmonol 29 (3): 172-176

Carroccio, A., Verghi, F., Santini, B., Lucidi, V., Iacono, G., Cavataio, F., Soresi, M., Ansaldi, N., Castro, M., Montalto, G. (2001) Diagnostic Accuracy of Fecal Elastase 1 Assay in Patients with Pancreatic Maldigestion or Intestinal Malabsorption, Dig Dis Sci 46 (6): 1335-1342

Dominguez-Muñoz, J.E., Effert, B., Sauerbruch, T., Malfertheiner, P. (1995) Dynamics and Factors Related with the ERCP-Induced Elevation of Serum Pancreatic Enzymes, Digestion 56: 280

Dominguez-Muñoz, J.E., Hieronymus, C., Sauerbruch, T., Malfertheiner, P. (1995) Fecal Elastase Test: Evaluation of a New Noninvasive Pancreatic Function Test, Am J Gastroenterol 90: 1834-1837

Doppl, W.E., Schnell-Kretschmer, H., Sziegoleit, A., Klör, H.U. (1994) Pankreaselastase 1 im Stuhl. Ein neuer Parameter zur Funktionsdiagnostik des exokrinen Pankreas, medwelt 45: 97 - 99

Elphick, D.A., Kapur, K. (2005) Comparing the Urinary Pancreolauryl Ratio and Faecal Elastase-1 as Indicators of Pancreatic Insufficiency in Clinical Practice, Pancreatology 5: 196-200

Fischer, B.P., Wehler, M., Rabenstein, T., Ell, C., Hahn, E.G., Schneider, H.T. (1998) Elastase-1 im Serum zur Früherkennung einer akuten Pankreatitis nach ERCP – Eine Pilotstudie, Z Gastroenterol. 36: 696

Fowler, M. (1998) Faecal Elastase 1 – A Suitable Test for the Investigation of Pancreatic Insufficiency in Children Newsletter, International Association of Pediatric Laboratory Medicine, Winter 1998

Glasbrenner, B., Schön, A., Klatt, S., Beckh, K., Adler, G. (1996) Clinical evaluation of the faecal elastase test in the diagnosis and staging of chronic pancreatitis, Eur J Gastroenterol Hepatol 8: 1117-1120

Gullo, L., Graziano, L., Babbini, S., Battistini, A., Lazzari, R., Pezzilli, R. (1997) Faecal elastase 1 in children with cystic fibrosis, Eur J Pediatr 156: 770-772

Gullo, L., Ventrucci, M., Tomassetti, P., Migliori, M., Pezzilli, R. (1999) Fecal Elastase 1 Determination in Chronic Pancreatitis, Dig Dis Sci 44 (1): 210-213

Hardt, P.D. and Kloer, H.U. (1998) Diabetes mellitus and exocrine pancreatic disease Pancreatic Disease: Towards the Year 2000 (eds.: Johnson, C.D. and Imrie, C.W., Springer Verlag): 33-39

Hardt, P.D., Bretz, L.; Krauss, A.; Schnell-Kretschmer, H.; Wüsten, O.; Nalop, J.; Zekorn, T.; Klör, H.U. (2001) Pathological Pancreatic Exocrine Function and Duct Morphology in Patients with Cholelithiasis, Dig Dis Sci 46 (3): 536-539

Hardt, P.D., Hauenschild, A., Nalop, J., Marzeion, A.M., Jäger, C., Teichmann, J., Bretzel, R.G., Hollenhorst, M., Klör, H.U. (2003) High prevalence of exocrine pancreatic insufficiency in diabetes mellitus. A multicenter study screening fecal elastase 1 concentrations in 1,021 diabetic patients, Pancreatology 3: 395-402

Hardt, P.D., Hauenschild, A., Jäger, C., Teichmann, J., Bretzel, R.G., Klör, H.U. (2003) High Prevalence of Steatorrhea in 101 Diabetic Patients Likely to Suffer from Exocrine Pancreatic Insufficiency According to Low Fecal Elastase 1 Concentrations, Dig Dis Sci 48: 1688-692

Hardt, P.D., Killinger, A., Nalop, J., Schnell-Kretschmer, H., Zekorn, T., Klör, H.U., (2002) Chronic Pancreatitis and Diabetes Mellitus, Pancreatology 2: 30-33

Hardt, P.D., Krauss, A., Bretz, L., Porsch-Özcürümez, M., Schnell-Kretschmer, H., Mäser, E., Bretzel, R.G., Zekorn, T., Klör, H.U. (2000) Pancreatic exocrine function in patients with type 1 and type 2 diabetes mellitus, Acta Diabetol 37: 105-110

Hardt, P.D., Marzeion, A.M., Schnell-Kretschmer, H., Wüsten, O., Nalop, J., Zekorn, T., Klör, H.U. (2002) Fecal elastase 1 measurement compared with endoscopic retrograde cholangiopancreatography for the diagnosis of chronic pancreatitis, Pancreas 25: e6-e9

Henker, J., Thamm, K. (1999) Untersuchungen zur exokrinen Pankreasfunktion bei Kindern und Jugendlichen mit Diabetes mellitus Typ I, Abstract/ 5. Ärztewoche Gastroenterologie/Viszeralchirurgie in Garmisch-Partenkirchen, 21.-26.02.1999

Icks, A, Haastert, B., Giani, G., W. Rathmann (2001) Low fecal elastase-1 in type I diabetes mellitus, Z Gastroenterol 39: 823-830

Katschinski, M., Schirra, J., Bross, A., Göke, B., Arnold, R. (1997) Duodenal Secretion and Fecal Excretion of Pancreatic Elastase-1 in Healthy Humans and Patients with Chronic Pancreatitis, Pancreas 15,2: 191-200

Leeds, J. S., Hopper, A. D., Hurlstone, D. P., Edwards, S. J., McAlindon, M. E., Lobo, A. J., Donnelly, M. T., Morley, S., Sanders, D.S. (2007) Is exocrine pancreatic insufficiency in adult coeliac disease a cause of persisting symptoms? Aliment Pharmacol Ther 25, 265–271

Leus, J., Van Biervliet, St., Robberecht, E. (2000) Detection and Follow up of Exocine Pancreatic Insufficiency in Cystic Fibrosis: A Review, Eur J Pediatr 159: 563-568

Löser, Chr., Brauer, C., Aygen, S., Hennemann, O., Fölsch, U.R. (1998) Comparative Clinical Evaluation of the 13C-Mixed Triglyceride Breath Test as an Indirect Pancreatic Function Test, Scand J Gastroenterol 33: 327-334

Löser C., Fölsch U. R. (1996) Diagnostik der chronischen Pankreatitis, Dtsch med Wschr 121: 243-247

Löser C., Mölgaard, A., Fölsch, U. R. (1996) Faecal elastase 1: a novel, highly sensitive, and specific pancreatic function test, Gut 39, 580-586

Malfertheiner, P., Büchler, M., Stanescu, A., Uhl, W., Ditschuneit, H. (1987) Serum elastase 1 in inflammatory pancreatic and gastrointestinal diseases and in renal insufficiency - A comparison with other serum pancreatic enzymes, Int J Pancreat 2: 159 - 170

Nissler, K., Von Katte, I., Huebner, A., Henker, J. (2001) Pancreatic Elastase 1 in Feces of Preterm and Term Infants, J Ped Gastroenterol Nutr 33: 28-31

Nunes, A. C .R., Pontes, J.M., Rosa, A., Gomes, L., Carvalheiro, M., Freitas, D. (2003) Screening for Pancreatic Exocrine Insufficiency in Patients with Diabetes Mellitus, Am J Gastroenterol 98 (12): 2672-2675

Peters, K., Lerche, L., Stange, E.F. (1998) Erhöhte Serum-Elastase als Risikofaktor für eine Post-ERCP-Pankreatitis Z Gastroenterol. 36: 697

Phillips, I.J., Rowe, D.J., Connett, G., Dewar, P. (1999) Faecal elastase 1: A marker of exocrine pancreatic insufficiency in cystic fibrosis, Ann Clin Biochem 36:739-742

Rathmann, W., Haastert, B., Icks, A., Giani, G., Hennings, S., Mitchell, J., Curran, S., Wareham, NJ., (2001) Low faecal elastase 1 concentrations in type 2 diabetes mellitus, Scand J Gastroenterol 36 (10):1056-61

Schappi, M.G., Smith, V.V., Cubitt, D., Milla, P.J., Lindley K.J. (2002) Faecal Elastase 1 Concentration is a Marker of Duodenal Enteropathy, Arch Dis Child 86(1):50-53

Scheefers-Borchel, U., Scheefers, H., Arnold, R., Fischer, P., Sziegoleit, A. (1992) Pankreatische Elastase 1: Parameter für die chronische und akute Pankreatitis, Lab. med. 16: 427 – 432

Salvatore, S., Finazzi, S., Barassi, A., Verzelletti, M., Tosi, A., d´Eril, G. V.M., Nespoli, L. (2003) Low Fecal Elastase: Potentially Related to Transient Small Bowel Damage Resulting from Enteric Pathogens, J Ped Gastroenterol Nutr 36: 392-396

Seno, T., Harada, H., Ochi, K., Tanaka, J., Matsumoto, S., Choudhury, R., Mizushima, T., Tsuboi, K. & Ishida, M. (1995) Serum Levels of Six Pancreatic Enzymes as Related to the Degree of Renal Dysfunction, Am J Gastroenterol 90: 2002-2005

Soldan, W., Henker, J., Sprössig, C. (1997) Sensitivity and Specificity of quantitative Determination of Pancreatic Elastase 1 in Feces of Children, J Ped Gastroenterol Nutr 24: 53-55

Stein, J. (1996) Where to place Human Elastase-1 in the Diagnosis of Pancreatic Insufficiency, Z Gastroenterol. 34 (S4): 6-10

Stein, J., Jung, M., Sziegoleit, A., Zeuzem, S., Caspary, W.F. Lembcke, B. (1996) Fecal immunoreactive elastase-1: Evaluation of a new tubeless pancreatic function test in comparison with other indirect and direct tests for exocrine pancreatic function Clin Chem 42: 222-226

Stein, J., Spirchez, Z., Lembcke, B., Caspary, F. (1997) Untersuchungen zur Bedeutung der Elastase-Bestimmung als einen neuen nicht-invasiven Test der exokrinen Pankreasinsuffizienz, Z Gastroenterol. (Suppl. 1): 122-129

Stevens, T., Conwell, D., Zuccaro, G., van Lente, F., Khandwala, F., Hanaway, P., Vargo, J.J., Dumot, J.A. Analysis of pancreatic elastase-1 concentrations in duodenal aspirates from healthy subjects and patients with chronic pancreatitis, Dig Dis Sci 49: 1405-1411

Sziegoleit, A., Krause, E., Klör, H.U., Kranacher, L. Linder, D. (1989) Elastase 1 and Chymotrypsin B in pancreatic juice and feces, Clin Biochem. 22: 85 - 89

Sziegoleit, A., Linder, D. (1991) Die menschliche Pankreaselastase 1, medwelt 42: 682 - 684

Teichmann, J., Lange, U., Hardt, P.D., Schnell-Kretschmer, H., Stracke, H., Bretzel, R.G., Klör, H.U. (2001) Pancreatic Elastase 1 in Patients with Osteoporosis, Abstract Congress Osteologie 2001, 4-7. April 2001, Wiesbaden

Terbrack, H.G., Gürtler, K.H., Hüls, G., Bittner-Dersch, P., Klör, H.U., Lindemann, H. (1996) Humanspezifische fäkale Pankreaselastase bei Kindern, Monatsschr. Kinderheilkd. 144: 901-905

Terbrack, H.G., Gürtler, K.H., Klör, H.U., Lindemann, H. (1995) Human Pancreatic Elastase 1 Concentration in Faeces of Healthy Children and Children with Cystic Fibrosis, Gut, 4th UEGW Berlin 2262: A 253

Walkowiak, J. (2004) Assessment of maldigestion in cystic fibrosis, J Pediatr 145: 285-287

Walkowiak, J., Cichy, W.K., Herzig, K.H. (1999) Comparison of Fecal Elastase-1 Determination with the Secretin-Cholecystokinin Test in Patients with Cystic Fibrosis Scand, J Gastroenterol 34(2): 201-207

Walkowiak, J. (2000) Faecal Elastase 1: Clinical Value in the Assessment of Exocrine Pancreatic Function in Children, Eur J Ped 159: 869-870

Walkowiak, J., Herzig, K.-H. (2001) Fecal Elastase-1 is decreased in villous atrophy regardless of the underlying disease, Eur J Clin Invest 31:425-430

Walkowiak, J., Herzig, K.-H., Strzykala, K., Przyslawski, J. and Krawczynski, M. (2002) Fecal Elastase-1 Is Superior to Fecal Chymotrypsin in the Assessment of Pancreatic Involvement in Cystic Fibrosis, Pediatrics 110: 1-4

Walkowiak, J., Nousia-Arvanitakis, S., Henker, J., Stern, M., Sinaasappel, M., Dodge J.A. (2005) Indirect Pancreatic Function Tests in Children, J Pediatr Gastroenterol Nutr 40: 107–114

Wallis, C., Leung, T., Cubitt, D., Reynolds, A. (1997) Stool elastase as a diagnostic test for pancreatic function in children with cystic fibrosis, The Lancet 350: 1001

Résumé du dosage pour l'utilisateur expérimenté

Important: Le résumé du protocole ne remplace pas le protocole détaillé inclus dans cette notice d`emploi**!**

ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 Stool Test for the quantitative determination of fecal levels of pancreatic elastase 1 by **healthcare professionals**.

- Préparer le tampon de lavage/-dilution pour échantillons et le tampon d`extraction
- Extraire et homogénéiser les fèces - Diluer l'extrait de fèces dans le tampon de lavage/-diluant pour échantillons
- Distribuer 50µl de blanc, étalons, contrôle et échantillons en doublets dans les barrettes ELISA - Incuber pendant 30 minutes à température ambiante - Laver
- Distribuer 50µl – complexe anti-E1-bio et POD-streptavidine (prête à l'emploi) - Incuber 15 minutes à température ambiante (obscurité) - Laver
- Distribuer 100µl de solution de substrat (prête à l'emploi) - Incuber 15 minutes à température ambiante (obscurité)
- Ajouter 100µl de solution d'arrêt (prête à l'emploi)
- Lire la plaque à DO_{405} ou DO_{405} - DO_{492}
- Calculer sur une courbe d'étalonnage à échelle bilogarithmique

Short protocol for the experienced user

Important: The short protocol is not a substitute for the detailed protocol given in this leaflet **!**

ScheBo® • Pancreatic Elastase 1 Stool Test for the quantitative determination of fecal levels of pancreatic elastase 1 by **healthcare professionals**.

- Prepare the sample-/washing buffer and the extraction buffer
- Extract and homogenize stool - Dilute stool extract in sample-/washing buffer
- Pipette 50 µl blank, standards, control and samples in duplicate in the ELISA-strips - Incubate 30 minutes at room temperature - Wash
- 50 µl anti-E1-bio and POD-Streptavidin-Complex (ready-to-use) - Incubate 15 minutes at room temperature (in the dark) - Wash
- 100 µl substrate solution (ready-to-use) - Incubate 15 minutes at room temperature (in the dark)
- Add 100 µl stop solution (ready-to-use)
- Read plate at OD_{405} or OD_{405} - OD_{492}
- Evaluate with standard curve using a log-log scale

© 2010 by ScheBo● Biotech AG · Netanyastr. 3 · 35394 Giessen (Germany)
Phone +49-(0)641-49 96-0 · Fax +49-(0)641 – 49 96-77 · www.schebo.com